

Dott. Maffo Vialli

---

## RICERCHE SULLE PSEUDOBANCHIE DEI PESCI

(NOTA PREVENTIVA)

---

Stavo occupandomi già da qualche tempo dello studio morfologico istologico e fisiologico delle pseudobranchie dei pesci quando sono venuto a conoscenza dei recentissimi lavori del Granel sullo stesso argomento. L'A. aveva trattato prima questo argomento in due note preventive presentate all'Académie des Sciences nell'agosto 1922, note di cui però io non avevo presa visione; il lavoro principale sull'argomento però non è uscito che nell'agosto 1923; ad esso fece seguito una breve comunicazione fatta nel marzo 1923 alla riunione della Association des Anatomistes e comparsa a stampa solo nel novembre (5, 6, 7, 8).

Occupandomi anch'io dell'argomento da punti di vista molto affini a quelli del Granel ero giunto in varie questioni a conclusioni molto simili a quelle del Granel stesso, e in queste io sono in grado di confermarne i dati; in altre questioni, invece, io non mi trovo in perfetto accordo, per altre ancora io ho ottenuto risultati che l'A. non aveva ricercati.

Pur avendo ancora in corso altre ricerche intorno a questo argomento che anche dopo lo studio del Granel è tutt'altro che esaurito tanto che io credo che ancor ora si possa dire col Müller (15) che « la struttura delle pseudobranchie deve essere annoverata tra le cose le più strane dell'anatomia comparata » credo bene esporre come nota preliminare alcuni dei risultati definitivi, a cui sono giunto finora, limitandomi a tre punti principali che appaiono tra loro slegati dato il carattere di nota preventiva di questo scritto: mi occuperò della costituzione anatomica, dei reperti istologici e della fine innervazione.

Mi riservo in seguito quando avrò terminati gli studii che ho attualmente in corso e che debbono estendere le nostre

conoscenze in senso comparativo anche ai selaci e ai ganoidi di cui Granel non si è occupato, di inquadrare anche meglio nel campo morfologico e fisiologico queste ricerche.

Le due prime note del Granel non sono, come già ho ricordato, che comunicazioni preventive rispetto al lavoro riassuntivo susseguente (7) e che è il più importante ed il più completo: la parte personale delle ricerche è costituita da una parte sulla costituzione anatomica delle pseudobranchie, da una embriologica e da una ultima parte istologica sulla struttura della lamella pseudobranchiale. Come conclusioni il Granel ricorda il carattere comune ai varii tipi anatomici di pseudobranchie di possedere uno strato di cellule acidofile, a causa delle quali egli attribuisce a questi organi il carattere di ghiandole vascolari sanguigne capaci di modificare la costituzione del sangue che le attraversa.

L'ultimo lavoro di Granel (8) riguarda in particolare la pseudobranchia di *Chrysophris aurata* in cui si ha un tipo anatomico differente da quelli che il Granel aveva già prima trovati, quindi secondo lui le modalità con cui si possono presentare le pseudobranchie possono essere quattro.

Le specie di teleostei da me prese in esame sono le seguenti:

*Esox lucius* Linn. *Barbus plebeius* Valenc., *Pomotis aureus* Gunther, *Tinca vulgaris* Cuv., *Cyprinus carpio* Linn. var. *specularis*, *Squalius cephalus* Linn.

#### Costituzione anatomica delle pseudobranchie.

Müller (15), che scoprì l'esistenza di pseudobranchie nascoste sotto l'epitelio che riveste la cavità branchiale, distingueva per questo carattere le pseudobranchie in libere e interne, ammettendo inoltre una terza categoria di pseudobranchie semilibere. A tale distinzione si rimette ancora il Maurer (12) in un suo lavoro. Secondo Granel tutte le pseudobranchie sono effettivamente coperte: questo fatto non era sfuggito alle mie ricerche prima che io potessi prendere visione dei lavori del Granel e in questo, almeno per le specie da me prese in esame, io debbo associarmi completamente alle sue conclusioni; debbo invece scostarmene per quanto riguarda la classificazione anatomica secondo quattro tipi.

Prendiamo senz'altro in esame quattro specie ascrivibili al quarto tipo di pseudobranchie. Granel caratterizza così questo

tipo di pseudobranchie: « une épaisse couche de corion vient doubler l'épithélium de la cavité branchiale. Dans ces conditions l'organe est profond et n'est plus visible par transparence au fond de la cavité branchiale; de plus il est enserré de toutes parts et obligé de se plier sur lui même d'ou la sinuosité de ses lames et de ses lamelles. Il en résulte une apparence de changement complet dans la situation, la forme, l'aspect général de l'organe ».

A questo tipo dovrebbero ascrivarsi le pseudobranchie coperte o glandolari di Müller; secondo Granel l'esempio di questo tipo di pseudobranchie si ha in *Cyprinus*. Confrontiamo tra loro le disposizioni di quattro delle specie da me prese in esame: *Cyprinus carpio*, *Tinca vulgaris*, *Barbus plebeius* e *Esox lucius*.

Quando si disseca una carpa allo scopo di estrarne le pseudobranchie, se si ha cura di togliere con precauzione il rivestimento della cavità branchiale, si pone a nudo la pseudobranchia la quale rimane ben staccata da quello che è il chorion sottostante all'epitelio di rivestimento; la pseudobranchia è avviluppata da un tessuto connettivo lasso e da tessuto grasso; il connettivo pseudobranchiale rappresenta una formazione a se che compenetra le lamelle. Molto simili sono le condizioni nel luccio dove ancor più spiccata è la differenza tra il connettivo proprio della pseudobranchia e quello che lo avviluppa. Il connettivo proprio studiato coi metodi elettivi mostra di formare una capsula che avvolge tutta la parte epiteliale dell'organo spingendosi nell'interno a occupare gli spazi che esistono tra le varie plumule. È un connettivo fibrillare non molto compatto, abbastanza ricco di elementi cellulari; le fibrille hanno un decorso concentrico alla porzione epiteliale; nell'interno di questo connettivo decorrono i vasi e i nervi della pseudobranchia, esso si continua collo stelo della plumula in cui decorrono anche la cartilagine di sostegno e i vasi. Le pseudobranchie di carpa e di luccio erano già state considerate come coperte da Müller; sempre secondo quest'ultimo autore le pseudobranchie di tinca sono da considerarsi come una forma di passaggio: senza forma di branchie ma ancora visibile dall'esterno; nel barbo le pseudobranchie secondo Müller sono libere.

Nella tinca al di sotto dello strato epiteliale di rivestimento della cavità branchiale si ha uno strato connettivale lasso che

può rappresentare il chorion e che insinuandosi tra le varie plumule ne forma anche il connettivo proprio formando un tutto unico simile al tipo che pone Granel. Le condizioni sono ancor più mutate nel barbo di cui Müller aveva classificato le pseudobranchie come libere, infatti l'osservazione colla lente e anche col binoculare dell'organo in toto da l'aspetto di una serie di plumule molto ravvicinate; l'esame istologico mostra invece che questo aspetto è dato da una serie di infossature che subisce l'epitelio e che si spingono tanto profonde da formare una specie di semicerchio attorno a porzioni connettivali entro cui corrono dei vasi piuttosto grossi: al disotto di queste porzioni connettivali si trovano le plumule pseudobranchiali quindi, data la presenza della copertura anche da parte del derma, queste pseudobranchie devono anch'esse essere ascritte al quarto tipo di Granel. La presenza di condizioni così differenti in pseudobranchie che secondo Granel sono da ascriversi a un solo tipo, mostra come sia necessaria una molto più completa conoscenza dell'anatomia microscopica delle singole specie per poter procedere a un tentativo di distinzione in gruppi.

Granel analizzando il lavoro di Grassi (10) sulle larve dei Murenoidi ritiene che le disposizioni trovate dal Grassi non abbiano nulla di contraddittorio e possano accordarsi colle disposizioni da lui trovate. Io non credo che si possa risolvere così semplicemente la questione che mi sembra in questo campo tutt'altro che chiarita. Il lavoro di Grassi verte su materiale larvale di una famiglia di pesci tanto caratteristica per le proprie metamorfosi, e il Granel parla di accordo senza essersi affatto preoccupato di vedere le disposizioni anatomiche che si hanno negli adulti. Grassi dà alle pseudobranchie larvali degli apodi da lui presi in esame il significato vero e proprio di organi respiratorii tanto che le denomina probranchie; e tutta la disposizione quale appare dai suoi disegni e dalle sue descrizioni è tale da giustificarne pienamente l'asserto. Come il Grassi stesso ricorda nell'anguilla adulta secondo gli antichi autori non esisterebbero pseudobranchie (1).

---

(1) Secondo Müller i seguenti generi di apodi non possiedono pseudobranchie: *Muraena* Lac., *Ophisurus* Lac.? *Gymnothorax* Bl., *Sphagebranchus* Bl., *Symbra* Bl., *Monopterus* Comm., *Gimnotus* Lac., *Carapus* C., secondo Meckel anche in *Leptocephalus* si ha mancanza di pseudobranchie. I seguenti generi hanno invece pseudobranchie libere: *Ophidium* Linn., *Fierasfer* C., *Ammodytes* Linn.,

Questo dato però secondo l'Autore sarebbe da rivedere, io ho eseguito per ora ricerche oltre che sulla anguilla adulta anche su *Conger conger* Linn. e non ho trovata alcuna traccia di pseudobranchie. Poichè gli altri generi citati da Müller come forniti di pseudobranchie sono tutti da ascrivere agli Ofididi, se le ricerche di Müller fossero confermate, negli apodi si avrebbe sempre mancanza di pseudobranchie allo stato adulto mentre esse sono presenti nelle larve, almeno nelle specie studiate da Grassi, in una forma differente da quella normale. Dopo quanto ho detto ritengo che si debba senz'altro ritenere che per risolvere la questione siano necessari nuovi studii, e non mi dilungo quindi per ora nella analisi delle differenze anatomo-microscopiche che esistono tra i reperti di Grassi e quelli di Granel.

#### Reperti istologici.

Nella lamella pseudobranchiale si distingue una lamina vascolare e delle cellule pseudobranchiali o acidofile come vengono chiamate dal Granel.

Sono ben note le cellule a pilastro scoperte dal Biéatrix nelle branchie dei pesci e in seguito illustrate anche da tutti gli altri autori che si sono occupati della questione. Il lavoro del Maurer (12), che è il primo lavoro istologico sulle pseudobranchie dei pesci, parlando della circolazione capillare nelle pseudobranchie non riconosce affatto la presenza di questi elementi che d'altra parte non erano ancora conosciuti neppure nelle branchie. Il merito della scoperta della presenza di questi elementi anche nelle pseudobranchie spetta al Grassi che le descrisse e le figurò nelle larve dei murenoidi. Il Granel (7) da una minuta descrizione della lamina vascolare e specialmente delle cellule a pilastro e dei limiti vascolari; io debbo in questo associarmi completamente alle vedute del Granel; aggiungerò che i nuclei delle cellule a pilastro appaiono anche nelle pseudobranchie dei pesci da me studiati spiccatamente lobati qualora siano studiati in sezioni normali alla lamina vascolare; il loro aspetto è totalmente simile a quello di alcune figure di Faussek (1) per le cellule a pilastro delle branchie e a una figura di Grassi (10) riguardante la pseudobranchia larvale di *Conger conger*. La lamina vascolare non è ben studiabile, specialmente in *Esox*, con tutti i fissativi poichè al-

cuni di essi possono talvolta provocare una retrazione tale delle cellule a pilastro da renderle pochissimo evidenti. Una fissazione che mi ha dato delle bellissime immagini, per quel che riguarda le cellule a pilastro e il limite vascolare di natura collagena che si colora secondo Granel col picroneronaftolo, è quella che si ha nel metodo Cajal per lo studio delle terminazioni nervose. Le cellule a pilastro si presentano allungatissime e nettamente visibili benchè il nucleo non sia fortemente differenziato; gli elementi che delimitano la cavità vascolare in seguito alla impregnazione assumono in parecchi punti un colore più oscuro delle cellule acidofile con cui sono in contatto.

Le cellule acidofile che rappresentano l'elemento caratteristico delle pseudobranchie erano già state viste e brevemente descritte dal Maurer (12); la descrizione istologica che ce ne dà il Granel è abbastanza completa e nelle loro linee fondamentali i miei reperti coincidono coi suoi, perciò senza diffondermi in particolari accennerò brevemente ad alcune differenze riscontrate.

Secondo Granel si possono distinguere tre categorie di cellule acidofile a seconda del loro particolare modo di comportarsi rispetto ai coloranti acidi. Alla prima categoria appartiene il più gran numero di cellule il cui protoplasma è nettamente diviso in due parti: una parte più fortemente colorata e granulata, attigua alle pareti vasali, l'altra periferica più chiara. Il nucleo è o totalmente compreso nella zona acidofila o vi è talmente affondato da sporgerne solo con una piccolissima parte; questo mio reperto è in disaccordo colla descrizione di Granel secondo cui il nucleo sarebbe generalmente compreso nella zona chiara benchè sia in parte affondato nella zona acidofila. I miei reperti concordano bene invece con quelli di Granel per quel che riguarda i caratteri del nucleo. L'estensione della zona cromofila può essere maggiore o minore tanto che molte volte è difficile, secondo me, segnare il passaggio tra questa categoria di cellule acidofile e la terza: in sezioni in cui le cellule siano tagliate ben ortogonalmente rispetto alla loro superficie di contatto colla lamina vascolare la zona può presentarsi talvolta molto appiattita nel senso della lamina oppure molto allungata nel senso ad essa perpendicolare. Una seconda categoria di cellule descritta da Granel è data da cellule a protoplasma tutto chiaro con rare granulazioni localizzate al

lato vascolare della cellula e a nucleo poco cromatico e periferico: mentre concordo con Granel per quel che riguarda la descrizione di questo tipo di cellule, credo di dover notare che secondo me quando si ha questa condizione essa è una condizione generale che colpisce tutta intiera una serie di preparati. Mi pare che questo particolare che merita di essere meglio studiato, e su cui mi propongo di ritornare anche con metodo sperimentale, sia di grande importanza nello stabilire un ciclo fisiologico della cellula.

Il terzo tipo di cellule secondo Granel, è dato da cellule che sono completamente acidofile; anche secondo l' A. queste cellule sono di gran lunga molto meno numerose di quelle delle altre due categorie, per mio conto, io, posso dire che sebbene talvolta si osservino figure di questo genere non ritengo giustificato, dato il loro numero esiguo, e perchè talvolta può darsi che si tratti di apparenze derivanti dalla superficie di sezione, il ritenere queste cellule come facenti parte del ciclo di attività cellulare.

Sono in grado di aggiungere qualcosa per la conoscenza isto-chimica delle cellule acidofile alle notizie date dal Granel, ho usato anch'io tutti i metodi usati da lui ad eccezione di quello di Regaud per i mitocondrii e mi associo a tutte le sue conclusioni.

Ho provato con esito negativo la reazione delle cellule cromaffini. Ho invece avuto delle figure che devono essere ricordate col metodo Bielchowski per il connettivo e col metodo Cajal per le terminazioni nervose. Il metodo Bielchowski pone in evidenza delle granulazioni di grandezza variabile sempre inferiore a  $0,5\mu$ , queste granulazioni si addensano, soprattutto, attorno al nucleo che però ne è completamente libero e che si presenta molto più chiaro del protoplasma; il protoplasma subisce l'impregnazione nella sola parte corrispondente alla porzione acidofila assumendo il solito colore grigio. Anche il Cajal da in alcuni casi figure molto simili, specie se si fissa con formalina invece che con alcool ammoniacale.

La porzione acidofila delle cellule assume quasi sempre in un modo, più o meno spiccato, un colorito più oscuro; nell'interno di queste zolle compaiono in molti casi delle granulazioni argentofile evidentemente dello stesso tipo di quelle di cui ho detto sopra per il Bielchowski; esse possono talvolta

assumere una grandezza lievemente superiore a quelle messe in evidenza col Bielchowski e sono in alcuni casi numerosissime. Granel basandosi soprattutto sul tipo di colorabilità dei protoplasmi acidofili emise l'ipotesi in un primo tempo che le pseudobranchie avessero una funzione di risparmio nell'economia della emoglobina; ulteriori ricerche tra l'altre quella del ferro hanno permesso già all'autore stesso di rigettare questa ipotesi. Del resto per quanto la colorabilità delle zolle acidofile possa ritenersi affine a quella dei globuli rossi, si nota tuttavia sempre una differenza che è minore coll'eosina, ma che è invece già molto evidente coll'acido picrico usato in modo da ottenere una colorazione piuttosto pallida. Ma la differente colorabilità spicca ancor di più usando la sola ematosilina Carazzi che ha una azione piuttosto generica e lasciando poi per lungo tempo in acqua si notano i globuli rossi colorati in giallo mentre le cellule acidofile hanno assunto un colore azzurro chiaro.

Riguardo alla genesi di questi elementi da tessuto connettivo debbo dire che allo stato adulto essi hanno totalmente perso questo carattere e che di conseguenza tutte le colorazioni elettive provate mi hanno dato risultati nettamente negativi (Traina, van Gieson, tricromica di Cajal). Ho invece potuto osservare anch'io dei nuclei allungati, che si intercalano in alcuni punti tra le lamelle, nuclei a cui il Granel dà il valore di elementi connettivali.

Per quanto l'impressione che si ha a prima vista dai preparati di pseudobranchie sia quella di essere di fronte a ghiandole a secrezione interna, tuttavia mi pare che, allo stato attuale della questione, non sia sufficientemente provata l'ipotesi del Granel, e ancor più mi sembra azzardato il negare senz'altro che si possa parlare di espulsione di secreto formato. Su questo punto mi riservo di esprimermi ulteriormente quando avrò terminate le ricerche sperimentali attualmente in corso.

#### Innervazione.

Il Granel non si è affatto occupato della innervazione delle pseudobranchie nè dal punto di vista del nervo che ad essa presiede nè da quello del modo con cui vi si termina. Müller (15) che già se ne era occupato riconobbe che la pseudobran-



chia è innervata dal ramo opercolare del nervo trigemino. Per lo studio della fine innervazione mi sono valso del metodo Cajal, sia colla solita fissazione in alcool ammoniacale, sia colla fissazione in formalina al 20 per cento. Sono riuscito a studiare la fine innervazione dell'epitelio, del connettivo e dei vasi. Lo studio della fine innervazione della branchia dei teleostei è stato eseguito da Maria Manfredi (11) che trovò che i nervi della branchia possiedono terminazioni diverse: libere, a pallina, a coroncina sia nei muscoli sia nell'epitelio sia nei vasi. Terminazione di questo tipo avevano già trovato R. Monti (13, 14) nell'intestino dei teleostei e Fusari (2, 3, 4) nelle branchie ed altri organi di *Ammocoetes branchialis*.

Nel connettivo periplumulare si mette con facilità in evidenza una fitta rete di fibre nervose che in alcuni punti decorrono parallelamente formando dei fasci veri e propri, in altri punti invece formano dei grovigli più o meno fitti assumendo il carattere di plessi. Queste fibre possono essere più



Fig. 1

Terminazioni nervose libere nella porzione epiteliale Luccio, Metodo Cajal Oculare Compens. 8 Zeiss Obiettivo apocromatico 1,5.

o meno sottili e presentano il solito aspetto di varicosità e sinuosità caratteristico delle fibre nervose. (fig.1). Anche la lamina connettivale di sostegno della plumula è percorsa da un fascio più o meno numeroso di fibre nervose che decorrono in senso normale alla cartilagine e ai vasi formando intorno ad essi un fitto viluppo di fibre e allargandosi in corrispondenza delle due porzioni esterne in guisa da abbracciare la plumula. Le terminazioni nervose dell'epitelio sono meno facilmente impregnabili; le fibre nervose provenienti dalla porzione connettivale che fa da scheletro alla plumula penetrano nell'epitelio

o meno sottili e presentano il solito aspetto di varicosità e sinuosità caratteristico delle fibre nervose. (fig.1). Anche la lamina connettivale di sostegno della plumula è percorsa da un fascio più o meno numeroso di fibre nervose che decorrono in senso normale alla cartilagine e ai vasi formando intorno ad essi un

nell'epitelio principalmente al livello di contatto dei due strati di cellule epiteliali (fig. 2) e, insinuandosi poi tra queste, penetrano fino al livello delle lamine vascolari, le fibre così penetrate nella porzione lamellare della plumula danno un fittissimo plesso molto aggrovigliato dividendosi e suddividendosi in modo da diventare sempre più sottili. Il loro decorso è apparentemente disordinato, il calibro è reso variabile dalla presenza delle solite varicosità. Le fibre così suddivise terminano liberamente a contatto colle cellule epiteliali e colla lamina va-



Fig. 2

Fine nervazione all'inizio delle lamine vascolari v. = vaso l. v. = lamina vascolare. I puntini delimitano la porzione occupata dalla lamina vascolare Luccio Metodo Cajal Oculare compens. 8 Zeiss Obiettivo apocromatico 1,5.

scolare con terminazioni a filamento. In certi punti a contatto delle cellule epiteliali più terminazioni possono attorniare una cellula formando una specie di involuppo (panieri pericellulari). Non ho notato terminazioni a pallina o a coroncina. L'innervazione si dimostra straordinariamente abbondante e ciò può

essere una prova dell'alto valore funzionale che deve avere quest'organo.

L'innervazione vasale è anch'essa ricchissima e riesce con particolare evidenza e facilità, essa si presenta simile a quella descritta precedentemente per i vasi dell'intestino dei pesci da R. Monti (13, 14), da M. Manfredi (11) nelle branchie, e da Fusari (2, 3, 4) per i petromizonti: si hanno cioè terminazioni libere e terminazioni a pallina.

*Pavia, Istituto di Anatomia e Fisiologia Comparate 25-1-1924.*

#### BIBLIOGRAFIA

1. — FAUSSEK V. *Beiträge zur Histologie der Kiemen bei Fischen und Amphibien* Archiv. f. mikroskopische Anatomie Bd. 60 1902.
2. — FUSARI R. *Contributo allo studio delle terminazioni nervose nei muscoli striati di *Ammocoetes branchialis**. Archivio per le Scienze Mediche, Vol. XXIX 1905.
3. — FUSARI R. *Contributo allo studio dei nervi cutanei e delle terminazioni nella cute e nella mucosa dell' *Ammocoetes branchialis**. Archivio per le Scienze Mediche, Vol. XXX 1906.
4. — FUSARI R. *Sulla terminazione dei nervi nell'apparecchio branchiale e nel velo boccale di *Ammocoetes branchialis**. Atti R. Accademia Scienze Torino, Vol. XLII 1907.
5. — GRANEL F. *Structure et développement de la pseudobranchie des Téléostéens*. C. R. Académie des Sciences, Vol. CLXXV 1922.
6. — GRANEL F. *Signification morphologique de la pseudobranchie des Téléostéens*. Idem, Vol. CLXXV 1922.
7. — GRANEL F. *Etude Histologique et Embryologique sur la Pseudobranchie des Téléostéens*. Archiv d'Anatomie d'Histologie et d'Embryologie, Vol. II 1923.
8. — GRANEL F. *La pseudobranchie de *Chrysoprhis aurata**. C. R. del' Association des Anatomistes, XVIII Reunion 1923.
9. — GRASSI B. *Sullo sviluppo dei Murenoidi*. Monografie del R. Comitato Talassografico Italiano 1913. Fischer Jena.
10. — GRASSI B. *Funzione respiratoria delle cosiddette Pseudobranchie dei Teleostei e altri particolari intorno ad esse*. Bios Vol. II 1914.
11. — MANFREDI M. *La fine struttura e l'innervazione delle lamelle branchiali dei pesci ossei studiate in *Tinca vulgaris**. Archivio Italiano di Anatomia e di Embriologia, Vol. XV 1916.
12. — MAURER F. *Ein Beitrag zur Kenntniss der Pseudobranchien der Knochenfische* Morpholog. Jahrbuch Bd. IX 1884.
13. — MONTI R. *Contributo alla conoscenza dei nervi del tubo digerente dei pesci*. Rendic. R. Istituto Lombardo di Scienze e Lettere S. II Vol. XXVIII 1895.
14. — MONTI R. *Ricerche anatomo comparative sulla minuta innervazione degli organi trofici dei cranioti inferiori*. Torino, Rosenberg e Sellier 1898.
15. — MÜLLER J. *Vergleichende Anatomie der Myxinoïden III Fortsetzung Ueber das Gefäßsystem*. Abhandlungen der Königlich, Akademie der Wissenschaften, Berlin aus dem Jahre 1839, 1841.
16. — OPPEL A. *Lehrbuch der vergleichenden mikroskopischen Anatomie der Wirbeltiere* Bd. VI Jena Fischer 1905.